



Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
Unidade Acadêmica de Serra Talhada - UAST
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

ANÁLISE DE LACASES DE MICRORGANISMOS COM APLICAÇÕES EM
BIORREMEDIAÇÃO USANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.

Andrey Giordane Costa Silva

Serra Talhada – PE

2022

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
Unidade Acadêmica de Serra Talhada - UAST
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

ANÁLISE DE LACASES DE MICRORGANISMOS COM APLICAÇÕES EM
BIORREMEDIAÇÃO USANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.

Andrey Giordane Costa Silva

Orientador: Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a banca avaliadora do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Biólogo.

Serra Talhada - PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a

Silva, Andrey Giordane Costa

ANÁLISE DE LACASES DE MICROORGANISMOS COM APLICAÇÕES EM
BIORREMEDIAÇÃO USANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA. / Andrey
Giordane Costa Silva. - 2022.

53 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Diego
de Souza Buarque. Inclui
referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2022.

1. Trametes. 2. Biorremediação. 3. 2,5-Xilidina. 4. Lacase. 5. Bioinformática . I.
Buarque, Prof. Dr. Diego de Souza, orient. II. Título

CDD 574

ANÁLISE DE LACASES DE MICRORGANISMOS COM APLICAÇÕES EM BIORREMEDIAÇÃO USANDO FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.

Monografia submetida à coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST) como requisito obrigatório para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 06/10/2022.

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Presidente/Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFRPE/UAST

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva (UFCA)
Universidade Federal do Cariri
(2° TITULAR)

Prof. Dr. Airton Torres Carvalho (UFERSA)
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
(3° TITULAR)

Serra Talhada – PE
2022

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a minha família que mesmo em altos e baixos estiveram comigo, deixa aqui registrado meus sinceros agradecimentos as meus falecidos avós Teófilo José da Silva que teve um papel importantíssimo para que eu me tornasse quem sou hoje. A minha Avó Francisca Maria de Silva que tal como meu avô sempre esteve comigo, me apoiou e me fez acreditar que tudo era possível.

Quero agradecer também as minhas tias Maria das Graças da Silva, Maria do Carmo da Silva e Maria Risomar da Silva por tudo que fizeram comigo, doaram a vida delas pela minha criação, investiram no que hoje sou. Carrego comigo essa gratidão eterna.

Quero agradecer também aos meus pais, Ana Maria da Costa Silva que sempre pude contar, e a meu pai José Teófilo da Silva que hoje não está mais aqui, porém, sou grato por tudo, o senhor sempre me apoiou e nunca vou esquecer do que me disse nas últimas semanas, que sentia orgulho de mim, que sentia orgulho de saber que eu iria me formar, foi por essas palavras que eu resolvi de fato concluir a universidade, saiba que sou muito grato por tudo.

Quero agradecer também aos meus irmãos Phillip Gustavo Costa Silva e Giordana Andressa Costa Silva por sempre estarem comigo, por serem necessários para que eu continuasse na universidade e me apoiando.

Aos amigos que a vida me deu Wesley Nunes, Thais Nunes, Maísa Godoy, Karen Villar, Marcia Daniele, Allef Willian, Júnior Vieira sou grato pela amizade.

Aos amigos que fiz durante a minha caminhada, eu não poderia deixar de menciona-los: a Ângela Maria que sempre foi a minha dupla na universidade, sempre apoiando um ao outro e sofrendo juntos em períodos difíceis. A Maria Beatriz a (Bia) que para mim foi uma surpresa, não esperava cultivar um carinho tão grande por ela, chegou de fininho e já ganhou um lugar maravilhoso em meu coração, admiro muito essa garota e desejo a ela um futuro maravilhoso. A Ericles Charles a outra surpresa, foi uma pessoa maravilhosa, da mesma forma

que Bia, também sempre me apoiou, sou grato e desejo que se torne um ótimo profissional, desejo uma carreira de sucesso.

Aos meus amigos Diogo Michel, Maiara Gonçalves, Maíra Beserra, Tamires Magalhães, Sara Lima, Denise Aparecida, Milena Nogueira vocês contribuíram e muito para minha permanência na universidade, foram companheiros e amigos quando precisei. Desejo a todos vocês um futuro magnífico, que se tornem ótimos profissionais e tenham uma carreira de sucesso.

Quero agradecer também a algumas pessoas que foram importantes nesse último ano de universidade, quero agradecer a Jadson Marroquim pelos conselhos e por toda a recepção e estadia. À Mírian Camelo quero agradecer pelo carinho, hospitalidade e conselhos que me deu, e obrigado por tudo que fez por mim, apesar de tudo considero a todos como família.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), que tornou possível meu sonho de ingressar no ensino superior de formar em Ciências Biológicas, um curso superior de excelência.

Agradeço ao Professor Rogério Saraiva por acreditar em mim e me guiar nesse caminho, mesmo estando hoje em outra instituição teve um papel importante para que eu pudesse chegar até aqui. Ao professor Diego Buarque agradeço por também acreditar em mim e por ter me aceito para me orientar nessa reta final.

Resumo

O descarte e lançamento inadequado de resíduos, resíduos domésticos, industriais, lixo eletrônico, fertilizantes, pesticidas podem elevar as concentrações ambientais de contaminantes que causam impactos significativos sobre a saúde humana e a biodiversidade. Diante desta problemática, o desenvolvimento de tecnologias que auxiliam no tratamento ambiental de locais contaminados por esses xenobióticos é de grande importância. Um método aplicável para remediação ambiental é a biodegradação por catalise enzimática. Lacases fúngicas (em especial as do gênero *Trametes*) possuem um grande potencial de aplicação na área de tratamento de efluentes e Biorremediação. Assim, uma análise das sequências torna-se importante para a determinação das lacases de alguns microrganismos. Para tal, utilizou-se o 1KYA, que representa o código uma estrutura de lacase ativa de *T. versicolor* presente no *Protein Data Bank* (PDB). Essa estrutura está complexada ao ligante 2,5-xilidina, o qual deriva solventes comercialmente utilizados. Por meio dessa análise, é possível entender fatores estruturais importantes para a enzima detoxificar compostos danosos ao meio ambiente, como a 2,5-xilidina. As estruturas e os sítios de ligação foram analisados através do programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021, onde foi possível identificar os resíduos de aminoácidos e as ligações que fazem parte do sítio da lacase 1KYA que interagem com a 2,5-xilidina. Para identificarmos fatores estruturais importantes nas sequências das lacases de microrganismos, foi feita uma comparação na sequência primária da lacase ativa (1KYA) com uma sequência conhecida da lacase de *Trametes versicolor* para determinar qual seria o grau de homologia entre elas e se todos os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo identificados. Ao verificar o grau de homologia entre diferentes tipos de lacases, de diferentes organismos, foi possível identificar sequências de 16 microrganismos com um percentual igual ou maior a 79,56%. Além disso, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos conservados em lacases de diferentes organismos e os resíduos que mudavam dentro as sequências dessa enzima.

Palavras chave: *Trametes*, Biorremediação, 2,5-xilidina, Lacase, Bioinformática.

Abstract

The improper disposal and dumping of household waste, industrial waste, electronic waste, fertilizers, pesticides can elevate environmental concentrations of contaminants that cause significant impacts on human health and biodiversity. Given this problem, the development of technologies that assist in the environmental treatment of sites contaminated by these xenobiotics is of great importance. An applicable method for environmental remediation is biodegradation by enzymatic catalysis. Fungal lacases (in particular those of the genus *Trametes*) have a great potential for application in the area of wastewater treatment and bioremediation. Thus, a sequence analysis becomes important for the determination of lacases from some microorganisms. For this, we used the 1KYA, which represents the code of an active lacase structure from *T. versicolor* present in the Protein Data Bank (PDB). This structure is complexed to the ligand 2,5-xylidine, which is derived from commercially used solvents. Through this analysis, it is possible to understand structural factors important for the enzyme to detoxify environmentally harmful compounds, such as 2,5-xylidine. The structures and binding sites were analyzed using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 program, where we were able to identify the amino acid residues and bonds that are part of the lacase 1KYA site that interact with 2,5-xylidine. To identify important structural factors in the sequences of lacases from microorganisms, a comparison was made in the primary sequence of the active lacase (1KYA) with a known sequence of the lacase from *Trametes versicolor* to determine what would be the degree of homology between them and if all amino acids that are part of the active site identified. By checking the degree of homology between different types of lacases from different organisms, it was possible to identify sequences of 16 microorganisms with a percentage equal to or greater than 79.56%. In addition, it was possible to identify the amino acid residues conserved in lacases from different organisms and the residues that changed among the sequences of this enzyme.

Key words: *Trametes*, Bioremediation, 2,5-xylidine, Lacase, Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais dos (a) ftalatos e do (b) bisfenol A	17
Figura 2. Fórmula estrutural da 2,5-xilidina.	17
Figura 3. Representação dos sítios ativos da Lacase	20
Figura 4. Estruturas cristalográficas de lacases de <i>T. versicolor</i>	22
Figura 5. Interações presentes no sitio ativo da lacase de <i>Trametes versicolor</i> 1KYA com o ligante 2,5-xilidina	24
Figura 6. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase de <i>Trametes versicolor</i> e do ligante (1KYA)	25
Figura 7. Arvore filogenética obtida através do alinhamento múltiplo pela ferramenta gratuita BLAST	27
Figura 8. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes villosa</i>	28
Figura 9. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Lenzites betulinus</i>	29
Figura 10. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Daedaleopsis nítida</i>	30
Figura 11. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Ganoderma leucocontextum</i>	31
Figura 12. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes pubescens</i>	42
Figura 13. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes ochracea</i>	43
Figura 14. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes hirsuta</i>	44
Figura 15. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes gibbosa</i>	45

Figura 16. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Trametes maxima</i>	46
Figura 17. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Trametes meyenii</i>	47
Figura 18. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Trametes elegans</i>	48
Figura 19. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Trametes polyzona</i>	49
Figura 20. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Dichomitus squalens</i>	50
Figura 21. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Ganoderma sinense</i>	51
Figura 22. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Ganoderma weberianum</i>	52
Figura 23. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da <i>Ganoderma lucidum</i>	53

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Organismos utilizados para obtenção da sequência FASTA no NCBI Protein	26
Tabela 2. Organismos identificados e quantidade de aminoácidos presente na suas respectivas sequencias primárias.	33

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	15
3. Referencial teórico.....	15
3.1 Contaminantes ambientais ou emergentes	15
3.2 Disruptores endócrinos.....	16
3.3 Principais substâncias	16
3.3.1 Xilidina.....	17
3.4 Biorremediação.....	18
3.5 Basidiomicetos	18
3.6 <i>Trametes versicolor</i>	19
3.7 Lacase	19
4. Metodologia.....	21
4.1 Obtenção da estrutura cristalográfica da lacase ativa (1KYA) da <i>Trametes versicolor</i>	21
4.2 Obtenção das sequencias FASTA da lacase ativa (1KYA) e dos demais organismos	21
4.3 Obtenção alinhamento das sequencias dos organismos identificados no Clustal Omega.....	22
5. Resultados e Discussão.....	22
5.1 Análise do sítio de ligação na lacase de <i>Trametes versicolor</i>	23
5.2 Análise comparativa da sequência FASTA do ligante (1KYA) e da <i>Trametes versicolor</i>	24
5.3 Identificação dos organismos através da ferramenta BLAST	25
5.4 Árvore filogenética	27
5.5 Análise dos resíduos de aminoácidos presentes nos organismos identificados.....	27
5.5.1 Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da <i>Trametes villosa</i> e do ligante (1KYA).....	28
5.5.2 Análise feita na sequência primária do <i>Lenzites betulinus</i> e de 1KYA.....	28
5.5.3 A análise feita na sequência primária do <i>Daedaleopsis nítida</i> e de 1KYA...	29
5.5.4 A análise feita na sequência primária do <i>Ganoderma leucocontextum</i> e do ligante (1KYA)	30
5.5.5 A análise feita nas sequências primárias dos organismos e do ligante (1KYA)	32
5.6 Resíduos de aminoácidos presentes nos organismos identificados.	32
6. Conclusão	33
7. Referências	34

1. Introdução

O descarte e lançamento inadequado de resíduos domésticos, industriais, lixo eletrônico, fertilizantes, pesticidas, derramamento de produtos petroquímicos e deposição atmosférica podem elevar as concentrações ambientais de contaminantes que causam impactos significativos sobre a saúde humana e a biodiversidade. Dentre estes contaminantes, destacam-se os disruptores ou desreguladores endócrinos (DEs), substâncias exógenas capazes de alterar a homeostase hormonal de vários organismos, causando sérios danos à saúde humana, ao crescimento e a reprodução de animais e ao declínio populacional de organismos aquáticos (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018). Os DEs incluem pesticidas, herbicidas, fármacos, estabilizadores de calor, plastificantes, produtos para cuidados pessoais (PCPs), entre outros (SPINA et al., 2015).

A partir desta problemática, o desenvolvimento de tecnologias que auxiliam no tratamento ambiental de locais contaminados por xenobióticos é de grande importância (TAVARES, 2013). Um método aplicável para remediação ambiental é a biodegradação por catalise enzimática. Lacases fúngicas (em especial as do gênero *Trametes*) possuem um grande potencial de aplicação na área de tratamento de efluentes e biorremediação. As lacases têm atraído interesse nas últimas décadas devido a sua aplicação em diversos ramos industriais como biocatalisadores, substituindo processos químicos nas indústrias têxtil, de celulose e papel e farmacêutica (MATE e ALCADE, 2016).

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem à classe das oxidases e seu sítio ativo é caracterizado pela presença de quatro átomos de cobre. Como estas enzimas possuem pouca especificidade a diferentes tipos de substratos, elas possuem habilidade de degradar diversos tipos de moléculas incluindo vários poluentes, como corantes, disruptores endócrinos, compostos fenólicos e outros (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018). A degradação ocorre por meio de uma reação de oxidação convertendo estes compostos nocivos em moléculas de menor toxicidade que podem ser separadas dos compartimentos ambientais por métodos físicos (SURESH, et al., 2008, LIU et al., 2018), podem ser aplicadas nos mais diversos processos de tratamento de efluentes. Além disso, lacases utilizam o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons, que já está

disponível no meio não necessitando adicionar nenhum cofator reduzindo assim o custo de sua aplicação quando comparada a outras enzimas utilizadas em tratamento de efluentes, como as peroxidases que necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (MACELLARO, et al., 2014) ou outros processos oxidativos avançados, como a reação de Fenton, ozonização ou oxidação fotocatalítica que são metodologias de mais alto custo (TAN; GOH; ISMAIL, 2015).

Dentre as ferramentas de bioinformática, a modelagem *in silico* consiste na aplicação de métodos teóricos utilizados para representar ou mimetizar o comportamento e interação de moléculas (RONCAGLIONI et al., 2008). Esta metodologia tem sido considerada promissora na descoberta e planejamento de novos fármacos, uma vez que ela motiva a possibilidade de redução do tempo e dos altos custos envolvidos (MAGALHÃES et al., 2007). De forma semelhante, pode também reduzir o tempo e os altos custos na prospecção de novas enzimas capazes de degradar contaminantes ambientais.

Segundo LIMA et al. (2015) várias pesquisas utilizando biorremediação para reduzir ou remover este tipo de contaminante tem ganhado destaque (LIMA et al., 2015). Pois a utilização de lacase como agente biorremediador é promissora, já que os requisitos simples de catálise e baixa especificidade a substratos tornam esta enzima capaz de oxidar uma gama de compostos. (PATEL et al.,2017). O objetivo desse trabalho é identificar os sítios ativos de lacases de diferentes microrganismos através de um levantamento de sequencias primárias, visando identificar o grau de homologia e possíveis aplicações a biorremediação a contaminantes ambientais, como a 2,5-xilidina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar o grau de homologia entre diferentes lacases de microrganismos através de ferramentas de bioinformática, visando identificar os resíduos de aminoácidos importantes para o sítio ativo dessas enzimas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento das sequências primárias de lacases de microrganismos a partir de banco de dados especializados (NCBI Protein);
- Identificar o sítio de ligação da estrutura de uma lacase ativa (1KYA) com o contaminante 2,5-xilidina;
- Analisar o grau de homologia entre as sequências primárias de lacases a partir do alinhamento múltiplo de sequências;
- Verificar o grau de conservação dos aminoácidos do sítio de ligação das lacases a partir da comparação dos resíduos de aminoácidos identificados em sequências de diferentes enzimas.

3. Referencial teórico

3.1 Contaminantes ambientais ou emergentes

Segundo Montagner e colaboradores (2017) os contaminantes emergentes apresentam ascendência tanto de origem antrópica (presentes em efluentes domésticos, industriais, hospitalares e aqueles provenientes das atividades agrícola e pecuária) - quanto de ocorrência natural (por exemplo, podem ser encontrados presentes em diferentes espécies de plantas).

Estes compostos podem apresentar algum risco ao ecossistema e eles não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina, ou seja, não são legislados. Assim, serão candidatos a uma futura regulamentação dependendo dos resultados obtidos em estudos de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana, potencial de bioacumulação, transporte e destino nos diferentes compartimentos ambientais, além da quantidade em que são lançados e, portanto, da concentração no ambiente (MONTAGNER et al., 2017)

Na última década, com o avanço tecnológico em técnicas analíticas, foi possível determinar e qualificar os compostos presentes em ambientes aquáticos com baixas concentrações. Esses compostos são encontrados em escalas de microgramas ou nanogramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}), e devido ao uso dessas tecnologias e a evolução de técnicas analíticas que foi possível dar o nome para esses compostos, sendo assim chamados de micropoluentes ou CEs. (SOARES; LEÃO, 2015).

Muitas das substâncias encontradas e classificadas são chamadas de interferentes endócrinos, já que, possuem ação desreguladora para o sistema endócrino. (SOARES; LEÃO, 2015).

3.2 Disruptores endócrinos

Um exemplo de contaminantes ambientais são os disruptores endócrinos, cuja presença em cursos de águas naturais representa um sério risco à fauna e à saúde pública, e diante deste cenário diversos experimentos têm sido realizados na tentativa de remover ou mesmo reduzir a toxicidade destas substâncias no meio ambiente (MEDRADO, 2017).

Segundo Medrado (2017), grande parte dos processos físico-químicos utilizados na remoção desses contaminantes emergentes, como os disruptores endócrinos, têm uma demanda elevada no custo de suas operações, e devido ao custo pesquisadores tentando encontrar formas alternativas de tratamento no ramo da biotecnologia. Um dos recursos encontrados é a biorremediação, onde, se caracteriza pela forma empregada de tratamento utilizando plantas, ou microrganismos que possuem ações enzimáticas capazes de remediar parcialmente ou totalmente alguns tipos desses contaminantes, dessa forma, fazendo com que surja técnicas eficazes prezando o custo-benefício (MEDRADO, 2017).

3.3 Principais substâncias

Segundo Sodré (2012), dentre os disruptores endócrinos, estrogênios naturais, estrogênios sintéticos e alguns xenoestrogênios tais como o bisfenol A, e ftalatos vêm ganhando maior destaque dentro da comunidade acadêmica e ambiental. Estes compostos têm sido mais estudados, pois suas ocorrências no ambiente, assim como seus possíveis efeitos sobre a biota, somente agora vêm sendo elucidados. Os Ftalatos Constituem uma classe de compostos orgânicos largamente empregada como plastificante em polímeros sintéticos, especialmente no cloreto de polivinila (PVC) (SODRÉ, 2012), para conferir maleabilidade a plásticos. Estão presentes em brinquedos, na composição de produtos cosméticos (esmaltes e perfumes), como aditivos em produtos de limpeza, e agrotóxicos, equipamentos médicos, produtos farmacêuticos, e solventes e tintas. (NATALIA KODAMA, 2012). Nos alimentos industrializados, os ftalatos podem estar presentes devido a contaminações durante o processo

produtivo, em função dos tipos de equipamentos utilizados, manuseio, transporte, armazenamento ou às próprias embalagens (NATALIA KODAMA, 2012). Já o O Bisfenol A é uma substancia bastante usada em processos industriais sendo um monômero na produção de policarbonato e resinas de poliéster-estireno insaturadas e retardantes de chama (SODRÉ, 2012). O bisfenol A é usado como agente plastificante e endurecedor em uma grande variedade de materiais. (SODRÉ *et al.*, 2007).

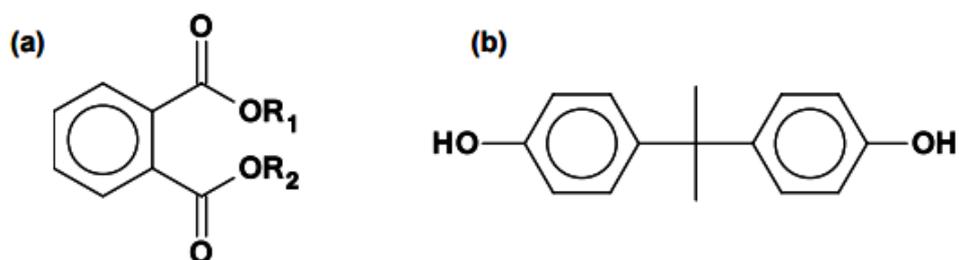


Figura 1. Fórmulas estruturais dos (a) ftalatos e do (b) bisfenol A. **Fonte:** (SODRÉ *et al.*, 2012).

3.3.1 Xilidina

A Xilidina, uma amina usada na fabricação de corantes, é conhecida como um excelente indutor de produção de Lacase, sendo a mais citada por pesquisadores. (Jardim, 2010). Em seus estudos Rancaño e colaboradores, (2003) diz que a alta eficiência da 2,5-xilidina ocorrer devido a uma resposta desse composto aromático para com o fungo, devido essa resposta, vai ocorrer um aumento no número de cópias de mRNA e com isso, um aumento na produção enzimática do fungo.

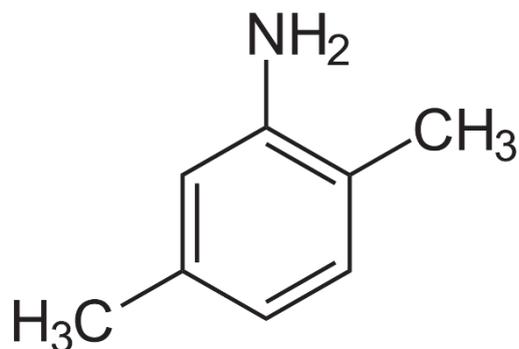


Figura 2. Fórmula estrutural da 2,5-xilidina. **Fonte:** (google imagens).

Alguns tratamentos complementares ou terciários para remover a presença de contaminantes emergentes acabam não funcionando perfeitamente, portanto, pode formar subprodutos com potencial toxicológicos maiores do que o próprio produto. Assim, investir em métodos mais baratos como a biorremediação aplicada a enzimas, poderá ser algo mais viável. (HOU et al., 2014).

3.4 Biorremediação

Segundo *GAYLARDE et al.*, (2005) biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados a partir da biotecnologia para remediar ou remover parcialmente poluentes no ambiente. Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção. Esses processos de biorremediação utilizando enzimas, em muitos casos são efetuados por fungos.

Segundo *HAIDER, et al.*, (2021) essas técnicas de biorremediação usando enzimas apresentam melhor viabilidade econômica, devida seu baixo custo, quando comparado a métodos a outras técnicas tradicionais de correção de áreas degradadas, são mais sustentáveis e minimizam o contato com o contaminante ambientais.

3.5 Basidiomicetos

Os fungos basidiomicetos são denominados por possuir estruturas protuberantes características chamadas de basídio, quais são responsáveis por produzir e armazenar os esporos (*MYCOKEY et al.*, 2006). Esses organismos em encontrados em diversos locais, seja no solo, na água, em animais, em plantas ou em qualquer detrito orgânico (*SANTIAGO et al.*, 2010).

Podem ser chamados de bolores, orelhas de pau, cogumelos e morfos. Sua alimentação é constituída principalmente de substancias orgânicas de origem diversa, como resto de animais em decomposição, serrapilheira, troncos de árvores, dentre outros resíduos orgânicos. Dessa forma, atuam como

recicladores, decompondo os constituintes de matéria orgânica. (SANTIAGO et al., 2010).

Os basidiomicetos são extremamente importantes pois têm participação direta em vários processos físico-químico que ocorrem na natureza. Dessa forma os torna importante para manutenção da vida na Terra. (MATHEUS & OKINO, 1998). A variedade de enzimas hidrolíticas secretadas por esses fungos permite que esse grupo de organismos degrade e utilize quase todas as fontes de materiais orgânicos disponíveis na natureza, sendo essencialmente importantes para manutenção do equilíbrio ecológico (LIMA, 2011).

3.6 *Trametes versicolor*

Trametes é um gênero que pertence ao filo dos Basidiomycota ou Basidiomicetes, é considerado um dos fungos mais estudados sobre o assunto da podridão branca (SI; PENG; CUI, 2013). Neste contexto, Zampieri (2006) fala que o fungo *Trametes versicolor* é normalmente encontrado em madeiras em regiões que apresentam clima tropical e ganhou esse nome devido à sua coloração e forma do corpo. Além disso, esse fungo apresenta um grande potencial biotecnológico na produção de enzimas, tal como a lacase e o manganês peroxidase por exemplo. Suas aplicações biotecnológicas englobam o tratamento de efluentes industriais, como de biocombustíveis, farmacêuticos, cosméticos, alimentos, químicos e entre vários outros (SI; PENG; CUI, 2013).

Segundo LING e et al., (2015) esse basidiomiceto apresenta um grau elevado de eficiência na produção de lacase, apresentando um alto rendimento em intervalos pequenos de tempo. Esses fungos vão apresentar um grande potencial para a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Nesse contexto, KIM E NICELL (2006B) afirmam que a lacase produzida pelo fungo *Trametes versicolor* tem um elevado potencial redox, ou seja, tornando seu uso bastante atrativo para a indústria.

3.7 Lacase

Segundo BAIL., (2020), as lacases, são enzimas multicobre oxidases, produzidas na natureza principalmente por fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. Segundo esses autores, essas enzimas possuem grande

importância ambiental, especialmente no processo de decomposição e mineralização da serapilheira florestal e do ciclo do carbono.

As lacases (EC1.10.3.2) são enzimas que catalisam uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono-, di- e polifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio para água. (PACHECO, 2014). Pertencem à classe das oxidases e seu sítio ativo é caracterizado pela presença de quatro átomos de cobre. Como estas enzimas possuem pouca especificidade à substratos, elas possuem a habilidade de degradar diversos tipos de moléculas incluindo poluentes, corantes, disruptores endócrinos, compostos fenólicos e outros (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018).

Os sítios ativos das lacases são T1, T2 e T3. O sítio T1 vai atuar como cobre mononuclear atuando como receptor primário de elétrons, o cobre triatômico redutor presente nos sítios T2 e T2 apresentará propriedades específicas as quais irá se diferenciar, atuando dessa forma no T2 no local da atividade catalítica e redox, enquanto o sítio T3 será responsável por ativar e transportar o O₂ e oxigenação do substrato, coordenado por três histidinas. (RIVERA-HOYOS et al., 2013; GIL et al., 2009; LIU et al., 2014; CHEN et al., 2015b).

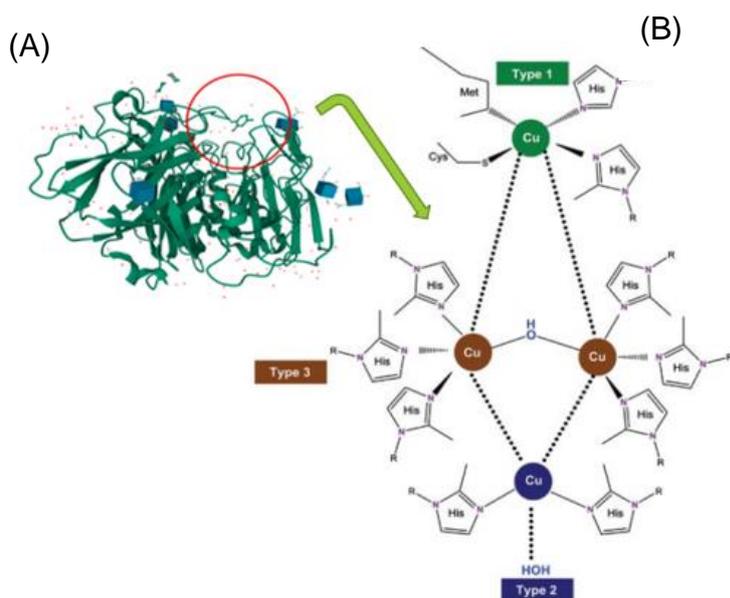


Figura 3. (A) Estrutura cristalográfica da lacase de *Trametes versicolor*; (B) Representação dos sítios ativos da Lacase. **Fonte:** (Boeckx et al., 2015; Protein data bank).

As lacases também são enzimas de grande importância biotecnológica em diversos setores industriais, os quais investem constantemente em importantes e promissoras pesquisas com a utilização desta enzima. As lacases apresentam diversas aplicações industriais, tal como branqueamento de polpa celulósica, melhor digestibilidade de materiais lignocelulósicos, além de ser usada na produção de ração animal, fermentação de chás e cafés, e principalmente na biorremediação de solos. (PACHECO, 2014; ALMEIDA, 2015; FRAZÃO et al., 2014).

Vários fatores podem influenciar a produção de enzimas pelos basidiomicetos, sendo que um dos principais é a presença de íons metálicos no meio de cultivo. Por outro lado, a temperatura e o pH são fatores importantes tanto na atividade como na estabilidade destas enzimas. (FONSECA et al., 2016).

4. Metodologia

4.1 Obtenção da estrutura cristalográfica da lacase ativa (1KYA) da *Trametes versicolor*

A busca para obter a estrutura cristalográfica do ligante (1KYA) da *Trametes versicolor* foi realizada no banco de dados do Protein Data Bank (PDB) </https://www.rcsb.org/>. Com a obtenção da imagem tridimensional, foi possível analisar o sítio ativo e suas ligações para análise no software BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

4.2 Obtenção das sequências FASTA da lacase ativa (1KYA) e dos demais organismos

A busca pelas sequências da lacase ativa (1KYA) da *Trametes versicolor* foi realizada no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Como critério de exclusão, foram buscadas sequências de organismos com percentual de identidade igual ou superior a 79.56% comparando à sequência FASTA do ligante da *T. versicolor*, a partir da ferramenta Basic Local Algorithm Search Tool (BLAST), optou-se por analisar apenas os organismos que apresentavam todos os 520 resíduos de aminoácidos para uma melhor análise.

4.3 Obtenção alinhamento das sequencias dos organismos identificados no Clustal Omega

As sequências obtidas foram submetidas ao site gratuito Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que é um software de alinhamento de múltiplas sequências. Após a codificação, as sequências são colocadas em uma caixa de texto. Para conseguir fazer o alinhamento foi escolhido nas configurações avançadas a estratégia de análise automática, isto fez com que o software reconhecesse qual melhor estratégia para as sequências. O alinhamento apresentou as características: Regiões conservadas, conservativas e seminconservativas, representadas respectivamente pelos símbolos: (*); (:); (.).

5. Resultados e Discussão

Embora algumas lacases de microrganismos tenham sido caracterizadas nos últimos anos, os procariontes têm sido amplamente negligenciados como fonte de novas enzimas, em parte devido à falta de conhecimento sobre a diversidade e distribuição de lacases de alguns microrganismos (Ausec *et al.* 2011).

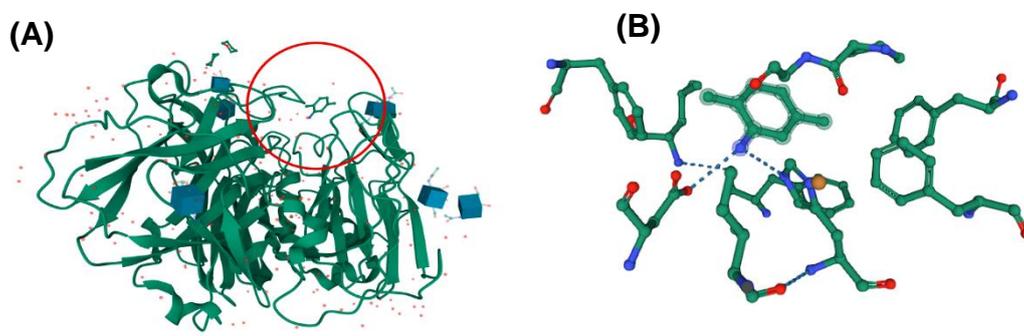


Figura 4. (A) Estruturas cristalográficas de lacases de *T. versicolor*. (b) Aminoácidos Ligantes. **Fonte:**

Assim, uma análise das sequências torna-se importante para a determinação das lacases de alguns microrganismos. Para tal, utilizou-se o 1KYA, que representa o código uma estrutura de lacase ativa de *T. versicolor* presente no *Protein Data Bank* (PDB). Essa estrutura está complexada ao ligante 2,5-xilidina, o qual deriva solventes comercialmente utilizados, já que segundo Kolmann e colaboradores, (2005) esse xenobiótico é conhecido por induzir a produção de lacase em fungos, esses autores ainda relatam que, essa indução é bastante usada em escala laboratorial ou industrial para obter grandes

quantidade de enzima para aplicação bioquímica. Isto foi feito para a identificação dos resíduos de aminoácidos da lacase 1KYA que interagem com esse ligante e que podem representar o sítio ativo da enzima. Por meio dessa análise, é possível entender fatores estruturais importantes para a enzima detoxificar compostos danosos ao meio ambiente, como a 2,5-xilidina.

5.1 Análise do sítio de ligação na lacase de *Trametes versicolor*

As estruturas e os sítios de ligação foram analisados através do programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021, onde foi possível identificar os resíduos de aminoácidos e as ligações que fazem parte do sítio da lacase 1KYA que interagem com a 2,5-xilidina. Os resíduos de aminoácidos encontrados a uma distância de 6 Å (Angstrom) do ligante foram a Fenilalanina (Phe 162,265,332,457), Prolina (Pro 163,391), Leucina (Leu 164,), Glicina (Gly 165,334,392), Aspartato (Asp 206), Asparagina (Asn 264), Alanina (Ala 393), Isoleucina (Ile 455) e Histidina (His 458). Já as ligações presentes estão representadas através de cores (Figura 2).

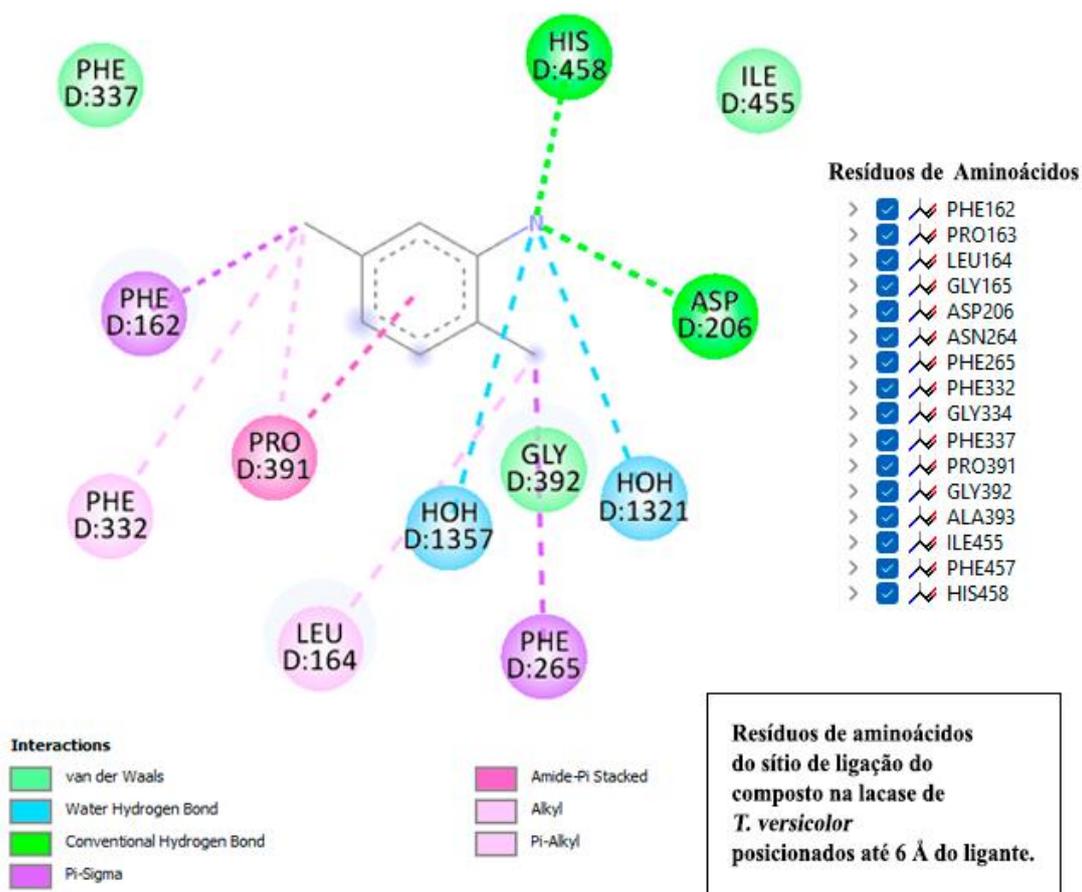


Figura 5. Interações presentes no sítio ativo da lacase de *Trametes versicolor* 1KYA com o ligante 2,5-xilidina. É possível identificar todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio da enzima a uma distância de 6 Å. Em verde é possível identificar as interações ou ligações de hidrogênio; em verde claro as interações de Van der Waals; em roxo as interações Pi-Sigma; em azul as interações com a água; Em Rosa as interações Amide-Pi Stacked. **Fonte:** Dados do autor, 2022.

5.2 Análise comparativa da sequência FASTA do ligante (1KYA) e da *Trametes versicolor*

Para identificarmos fatores estruturais importantes nas sequências das lacases de microrganismos, foi feita uma comparação na sequência primária da lacase ativa (1KYA) com uma sequência conhecida da lacase de *Trametes versicolor* (**Figura 3**), para determinar qual seria o grau de homologia entre elas e se todos os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo identificados na análise feita pelo programa Discovery Studio estariam presentes em ambas as sequências, foi utilizada a ferramenta Clustal Omega. Através do alinhamento múltiplo usando o clustal Omega foi possível observar que tanto a sequência primária de 1KYA, quanto de *T. versicolor* apresentaram os 16 resíduos de

aminoácidos que são a Fenilalanina (Phe 162,265,332,457), Prolina (Pro 163,391), Leucina (Leu 164,), Glicina (Gly 165,334,392), Aspartato (Asp 206), Asparagina (Asn 264), Alanina (Ala 393), Isoleucina (Ile 455) e Histidina (His 458), identificados na análise no programa Discovery Studio.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVGSTPGPLITGNM    40
Trametes  MGLQRFSEFFVTLALVARSLAAIGPVASLVVANAPVSPDDFLRDAIVVNGVVPSPPLITGKK    60
          .*****.*.:** ***. * *:***** .*.*****:

1KYA      GDRFQLNVIDNLTNHTMLKSTS IHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQVP    100
Trametes  GDRFQLNVVDTLTNHSMKSTS IHWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFHVP    120
          *****:*.****:***** ***:*****:*****:*****:***

1KYA      DQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDVDNDDTVITLVDWYHVAAKLGP    160
Trametes  DQAGTFWYHSRLSTQYCDGLRGPVVYDPKDPHASRYVDVNESTVITLTDWYHTAARLGP    180
          *****:*****:*** * . *****:*****.****.***

1KYA      AFPLADATLINGKRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLSLSCPNYTFSIDGHNMTI    220
Trametes  RFPLADATLINGLGRSASTPTAALVINVQHGRYRLRVLVSLSCPNYTFSIDGHNLTV    240
          ***** ** * * * *:*** * *****:*****:*****:***

1KYA      IETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEANQAVDNYWIRANFNGVNGFTGGINSAILR    280
Trametes  IEVDGINSQPLLVDLSIQIFAAQRYSFVLNANQTVGNVWVRANFNGTVGFAGGINSAILR    300
          **.*. **: *.*****:***:*.***:*****.***:*****

1KYA      YDGAAAVEPTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENGTNFIN    340
Trametes  YQGAPVAEPTTQTSPVIPLIETNLHPLARMPVPGSPTPGGVDKALNLAFNENGTNFIN    360
          *:** ..***** * . ** *.*****. *****. **** *:*****

1KYA      GASFTPPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHLH    400
Trametes  NASFTPPTVPVLLQLLSGAQTAQELLPAGSVYPLPAHSTIEITLPATALAPGAPHPFHLH    420
          .*****:*****.***:***:*** **:: **:*****

1KYA      GHAFVVRSA GSTVYNDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRTDNGPWFLHCHIDFHE    460
Trametes  GHAFVVRSA GSTTYNDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRTDNGPWFLHCHIDFHE    480
          *****.*.:*****:*****:*****:*****

1KYA      AGFAVFAEDIPDVASANPVPQAWS DLCPTYDARDPSDQ    499
Trametes  AGFAIVFAEDVADVKAANPVPKAWSDLCPIYDGLSEANQ    519
          ***:***: ** :*****:***** ** . . ::*

```

Figura 6. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse de *Trametes versicolor* e do ligante (1KYA) obtido a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos.

5.3 Identificação dos organismos através da ferramenta BLAST

Após a análise do alinhamento múltiplo entre a sequências primária de 1KYA e da lacase conhecida de *Trametes versicolor*, a sequência FASTA foi submetida à ferramenta BLAST, onde foi possível a identificação de sequências de organismos com um percentual de identidade igual ou superior a 79,56, esse percentual está relacionado aos resíduos de aminoácidos presentes no sitio ativo

da lacase. Feita a identificação, foram reunidas as 16 espécies com resíduos de até 520 aminoácidos.

Dos 16 organismos identificados (**Tabela 1**), 5 apresentaram uma taxa de percentual de 90.38% a 99.20%, com isso apresentando uma maior taxa de identidade para com o ligante 1KYA da *Trametes versicolor*. São estes: *Trametes villosa* tendo uma taxa de percentual de 99,20%, *Trametes pubescens* tendo uma taxa de percentual de 96,99%, *Trametes ochracea* tendo uma taxa de percentual de 95,99%, *Trametes hirsuta* tendo uma taxa de percentual de 91,16% e *Lenzites betulinus* apresentando uma taxa de 90.38%. Com isso é possível identificar que quatro organismos pertencem ao gênero *Trametes*, enquanto um pertencem ao gênero *Lenzites* ambos pertencem aos basidiomicetos.

Tabela 1. Organismos utilizados para obtenção da sequência FASTA no NCBI Protein, onde apresenta o percentual de identidade dos resíduos de aminoácidos presentes no sitio ativo da lacase *Trametes versicolor*. **Fonte:** Dados do autor, 2022.

Organismos	Número de acesso (NCBI Protein)	Percentual	Filo
<i>Trametes villosa</i>	>Q99044.1	99.20%	Basidiomycota
<i>Trametes pubescens</i>	>AAM18407.1	96.99%	Basidiomycota
<i>Trametes ochracea</i>	>ALT22024.1	95.99%	Basidiomycota
<i>Trametes hirsuta</i>	>Q02497.1	91.16%	Basidiomycota
<i>Lenzites betulinus</i>	>KAH9849284.1	90.38%	Basidiomycota
<i>Trametes gibbosa</i>	>AEP71394.1	89.18%	Basidiomycota
<i>Trametes maxima</i>	>KAI0673713.1	88.78%	Basidiomycota
<i>Trametes meyenii</i>	>KAI0652439.1	88.58%	Basidiomycota
<i>Trametes elegans</i>	>KAI0778757.1	87.78%	Basidiomycota
<i>Trametes polyzona</i>	>KAI0639993.1	86.92%	Basidiomycota
<i>Daedaleopsis nitida</i>	>KAI0756312.1	83.97%	Basidiomycota
<i>Dichomitus squalens</i>	>XP_007360655.1	80.92%	Basidiomycota
<i>Ganoderma sinense</i>	>PIL30426.1	80.76%	Basidiomycota
<i>Ganoderma leucocontextum</i>	>KAI1791912.1	80.36%	Basidiomycota
<i>Ganoderma weberianum</i>	>ANA53145.1	80.12%	Basidiomycota
<i>Ganoderma lucidum</i>	>AHA83584.1	79.56%	Basidiomycota

5.4 Árvore filogenética

Na figura 4 é apresentada a árvore filogenética obtida na ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Os parâmetros para obtenção dessa árvore seguiram os mesmos utilizados para obter o resultado das sequências dos 16 organismos encontrados.

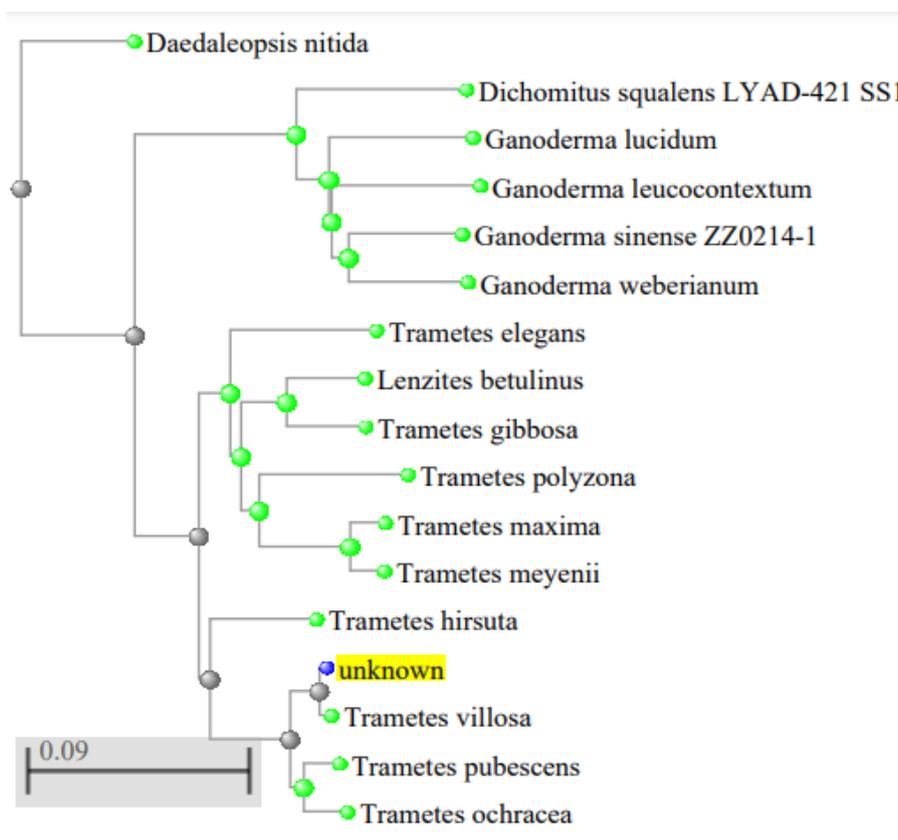


Figura 7. Arvore filogenética obtida através do alinhamento múltiplo pela ferramenta gratuita BLAST. Em verde são todos os fungos basidiomicetos, em azul é a sequência primária da lacase 1KYA.

5.5 Análise dos resíduos de aminoácidos presentes nos organismos identificados.

Após obter o resultado usando a ferramenta BLAST para identificar os 16 organismos próximos, foi feita uma reanálise, onde a partir dessa nova verificação, foi observado se todos os organismos apresentam os resíduos de aminoácidos encontrados na sequência primária da lacase 1KYA, os quais formam o seu sítio ativo.

5.5.1 Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes villosa* e do ligante (1KYA)

Após a análise feita na sequência primária da *Trametes villosa* (Figura 5) foi possível visualizar a presença de todos os 16 aminoácidos, sendo eles idênticos e conservados. Os aminoácidos identificados são Phe (162,265,332,457), Pro (163,391), Leu (164), Gly (165,334,392), Asp (206), Asn (264), Ala (393), Ile (455) e His (458), presentes na sequência de 1KYA.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 39
T.villosa MSRFHSLLAFFVVASLTAVAHAGIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 60
          *****

1KYA      MGDRLFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 99
T.villosa MGDRLFQLNVIDNLTNHTMVKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 120
          *****:*****

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDNPDAADLYDNDVITLVDWYHVAAKLG 159
T.villosa PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDNPDAADLYDNDVITLVDWYHVAAKLG 180
          *****

1KYA      PAFPLGADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLVSLCIPNYTFSIDGHNMT 219
T.villosa PAFPLGADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLVSLCIPNYTFSIDGHNMT 240
          *****

1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAQVDNYWIRANPEFGNVGFTGGINSAIL 279
T.villosa IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAQVDNYWIRANPEFGNVGFTGGINSAIL 300
          *****

1KYA      RYDGAAAVEPTTTQTTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNFNTNFI 339
T.villosa RYDGAAAVEPTTTQTTSTAPLNEVNLHPLVTAVPGSPVAGGVDLAINMAFNFNTNFI 360
          *****:*****

1KYA      NGASFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAFAGAPHPFHL 399
T.villosa NGTSFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAFAGAPHPFHL 420
          **:*****

1KYA      HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNP IFRD VVSTGTPAAGDNVTIRFR TDNPGPWF LHC H D F H L 459
T.villosa HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNP IFRD VVSTGTPAAGDNVTIRFR TDNPGPWF LHC H D F H L 480
          *****

1KYA      EAGFAVVAEDIPDVASANPVPQAWS DLCPT YDARDPSDQ 499
T.villosa EAGFAVVAEDIPDVASANPVPQAWS DLCPT YDALDPSDQ 520
          *****

```

Figura 8. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes villosa* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor, 2022.

5.5.2 Análise feita na sequência primária do *Lenzites betulinus* e de 1KYA

A análise feita na sequência primária da *Lenzites betulinus* (Figura 5) mostrou uma alteração na posição 264 da cadeia de aminoácidos, onde existe uma substituição do asparagina por uma serina, isso usando em comparação a

sequência primária do ligante (1KYA) da *T. versicolor*. No entanto, essa substituição não acarreta em alterações funcionais significativas, já que a Asparagina (N) e Serina (S) contém grupos funcionais que formam ligações de hidrogênio com a água, já que o grupo amida da asparagina e o grupo hidroxila da serina contribuem para suas polaridades (Nelson, 2014).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

1KYA      -----GIGPVADLTIITNAAVSPDGFSRQAVVNVGGTTPGPLITGN      39
Lenzites  MSRFQSLLAFLVLTSLTAAVYAGIGPVADLTIITNAEVSPDGFARQAVVNVGGTTPGPLVTGN      60
          *****:*****:*****:*****:*****

1KYA      MGRDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV      99
Lenzites  MGRDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQA      120
          *****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVYVDPNDPAADLYDNDTIVITLVDWYHVAAKLG      159
Lenzites  VDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVYVDPNDPNSLYDNDTIVITLADWYHVAAKLG      180
          *****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PAFPIADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLVSLSCPNYTFSIDGHNMT      219
Lenzites  PRFPIADATLINGLGRSPSTTSDLAVISVTPQGKRYRFRVLVSLSCPNHFTFSIDGHEMT      240
          * *****:*****:***** *****:*****:*****

1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEANQAVDNYWIRANPFGNVGFTGGINSAIL      279
Lenzites  IIETDSVNTQPLVVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPSFGNVGFAGGINSAIL      300
          *****:*****:*****:*****:*****

1KYA      RYDGAAVEPTTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNINGTNFI      339
Lenzites  RYDGAAVEPTTTQTSTAPLNEVDLHPLTPMPVPGEPVAGGVDKPLNMAFNINGTNFEFI      360
          *****:*****:***** *****:*****:*****

1KYA      NGASFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL      399
Lenzites  NGESFVPTPTVPVLLQILSGAQTAQDLLPSGSVYVLPNSASIEITFPATAAAPGAPHPFHL      420
          ** *:*****:*****:***** *****:*****:*****

1KYA      HGHAFAVVRSAAGSTVYNDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRTDNPFPWFLHCHIDFHL      459
Lenzites  HGHTFAVVRSAAGSTVYNDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFQTNNPFPWFLHCHIDFHL      480
          ***:*****:*****:*****:*****

1KYA      EAGFAVVFAEDIPDVASANPVPQAWSDLCPDYDARDPSDQ      499
Lenzites  DAGFAVVAEDTPDVAAVNPVPQAWSDLCPDYDALDPSDQ      520
          :*****:*** *****:*****:***** *****

```

Figura 9. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Lenzites betulinus* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor, 2022.

5.5.3 A análise feita na sequência primária do *Daedaleopsis nítida* e de 1KYA

A análise feita na sequência primária da *Daedaleopsis nítida* (Figura 7) mostrou uma alteração na posição 393 da cadeia de aminoácidos, onde existe uma substituição da Alanina por uma Treonina, isso usando em comparação a sequência primária da lacase ativa 1KYA. No entanto, essa substituição pode

aminoácido hidrofílico, ou seja, apresenta maior afinidade com a água devido ao seu grupo hidroxila.

5.5.5 A análise feita nas sequências primárias dos organismos e do ligante (1KYA)

As análises feitas nas sequências primárias (Anexo I) da *Trametes pubescens*, *Trametes ochracea*, *Trametes hirsuta*, *Trametes máxima*, *Trametes meyenii*, *Trametes polyzona*, *Dichomitus squalens*, *Ganoderma sinense*, *Ganoderma weberianum* e *Ganoderma lucidum* obtiveram o mesmo padrão da *Trametes villosa* (Figura 5), onde foi possível identificar os 16 aminoácidos, sendo eles idênticos e conservados.

Já a análise feita nas sequências primárias dos organismos (Anexo I) *Trametes gibbosa* e *Trametes elegans* obtiveram o mesmo padrão da *Lenzites betulinus* (Figura 6), onde foi possível identificar os 15 aminoácidos, sendo eles idênticos e conservados e uma alteração na sequência, onde não acarretou em problemas em suas funcionalidades.

5.6 Resíduos de aminoácidos presentes nos organismos identificados.

Feita a análise dos resíduos dos aminoácidos presentes nas sequências primárias dos organismos identificados pelo BLAST, verificou-se que dos 16 indivíduos, 5 (cinco) tiveram alterações na sua sequência primária em relação à lacase 1KYA (Tabela 2).

Tabela 2. Organismos identificados e aminoácidos trocados em relação à sequência primária de aminoácidos da lacase 1KYA.

Organismos	Resíduos de Aminoácidos
<i>Trametes villosa</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Trametes pubescens</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Trametes ochracea</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Trametes hirsuta</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Lenzites betulinus</i>	Asn 264 por Ser 264
<i>Trametes gibbosa</i>	Asn 264 por Ser 264
<i>Trametes maxima</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Trametes meyenii</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Trametes elegans</i>	Asn 264 por Ser 264
<i>Trametes polyzona</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Daedaleopsis nitida</i>	Ala 393 por Tre 393
<i>Dichomitus squalens</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Ganoderma sinense</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Ganoderma leucocontextum</i>	Leu 164 por Fen 164; Asn 264 por Ser 264.
<i>Ganoderma weberianum</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos
<i>Ganoderma lucidum</i>	Todos os 16 resíduos de aminoácidos

6. Conclusão

Com este trabalho foi possível analisar, através de ferramentas de bioinformática, sequências lacases de diferentes organismos em comparação a uma lacase ativa de *T. versicolor* (1KYA). Ao verificar o grau de homologia entre diferentes tipos de lacases, de diferentes organismos, foi possível identificar sequências de 16 microrganismos com um percentual igual ou maior a 79,56%. Além disso, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos conservados em lacases de diferentes organismos e os resíduos que mudavam dentre as sequências dessa enzima. Com isso foi possível identificar os resíduos de aminoácidos importantes para o sítio ativo da lacase de microrganismos e tentar entender futuramente a importância desses resíduos na degradação do contaminante 2,5-xilidina.

7. Referências

ALMEIDA, A. R. **Estudo da imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas e sua aplicação**.89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial e Ambiental) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Curitiba, 2015.

AUSEC L, Zakrzewski M, Goesmann A, Schlüter A, Mandic-Mulec I (2012) **Correction: Bioinformatic Analysis Reveals High Diversity of Bacterial Genes for Laccase-Like Enzymes. PLoS ONE** Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/annotation/2c1232ba-94f0-4613-8486-0f430b1b47ed>> [Acessado 20 Setembro 2022]

BAIL, Jaqueline. **Lacase e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 05, Ed. 10, Vol. 14, pp. 21-30. outubro de 2020. ISSN: 2448-0959, Disponível em: <<https://www.nucleodoconhecimento.com.br/biologia/lacase>> [Acessado 5 Maio 2022]

BARRIOS-ESTRADA, C. et al. **Emergent contaminants: endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation—a review. Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516-1531, 2018.

CHEN, M.; ZENG, G.; LAI, C.; LI, J.; XU, P.; WU, H. **Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of Trametes versicolor laccase with various lignin model compounds. RSC Adv.**, v. 5, n. 65, p. 52307–52313, 2015b.

DE OLIVEIRA, D. B.; GAUDIO, A. C. **BuildQSAR: a new computer program for QSAR analysis. Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 19, n. 6, p. 599-601, 2000.

FRAZÃO, C. J. R.; SILVA, N. H. C.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; XAVIER, A. M. R. B.; TAVARES, A. P. M. **Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

FONSECA, M. A. **Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Eng. Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

FRISCH, M. J. et. al. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASSO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. **Biorremediação. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GHISELLI, Gislaíne e Jardim, Wilson F. **Interferentes endócrinos no ambiente**. Química Nova [online]. 2007, v. 30, n. 3 [Acessado 5 Maio 2022] , pp. 695-706. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>>.

GIL, E. S. et al. **Biosensor based on Brut Extract from laccase analysis of phenolic compounds**. Portugaliae Electrochimica Acta. 27(3):215-225, 2009.

HABTEMARIAM, S. (2020). *Trametes versicolor* (Synn. Coriolus versicolor) **Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy**. *Biomedicines*, 8(5), 135. doi:10.3390/biomedicines8050135

HAIDER, F. U., Ejaz, M., Cheema, S. A., Khan, M. I., Zhao, B., Liqun, C., Salim, M. A., Naveed, M., Khan, N., Núñez-Delgado, A., & Mustafa, A. (2021). Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111031>.

HOU, J.; DONG, G.; LUU, B.; SENGPIEL, R. G.; YE, Y.; WESSLING, M.; CHEN, V. Hybrid membrane with TiO₂ based bio-catalytic nanoparticle suspension system for the degradation of bisphenol-A. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 475–483, 2014.

HONGYAN, L. et al. **Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking**. *Chemosphere*, v. 224, p. 743-750, 2019.

JARDIM, V L. **Seleção de fungos de decomposição branca para a redução da toxicidade do acefato**, Dissertação Pós-Graduação, Goiás. 2010. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/601/1/dissertacao%20valeria%20de%20Lima%20Jardim%202010.pdf>> [acessado 03 outubro 2022]

JIANG, G. X. et al. **Prediction of biodegradation rate constants of hydroxylated polychlorinated biphenyls by fungal laccases from *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus***. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 81, n. 1, p. 1-6, 2008.

KOLLMANN, Albert & Boyer, François-Didier & Ducrot, Paul-Henri & Kerhoas, Lucien & Jolival, Claude & Touton, Isabelle & Einhorn, Jacques & Mougín, Christian. (2005). **Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745**. Applied microbiology and biotechnology. 68. 251-8. 10.1007/s00253-004-1860-7

LING, Z.; WANG, S.; ZHU, M.; NING, Y.; WANG, S.; LI, B.; YANG, A.; ZHANG, G.; ZHAO, X. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp . LAC-01. International Journal of Biological Macromolecules, v. 81, p. 785–793, 2015.

LIU, Y.; CUSANO, A. M.; WALLACE, E. C.; MEKMOUCHE, Y.; ULLAH, S.; ROBERT, V.; TRON, T. **Characterization of C-terminally engineered laccases**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 69, p. 435–441, 2014.

LIU, Y. et al. **Effect of surfactants on the interaction of phenol with laccase: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies**. Journal of Hazardous Materials, v. 357, p. 10-18, 2018.

LIU, Z. et al. **Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review**. Chemosphere, v. 203, p. 139-150, 2018.

LIMA, A. S. B.; SIMÃO, C. J. B; SILVA, F. J. S.; RODRIGUES, J. R. F.; ARAUJO, T. C. A biorremediação como técnica de tratamento de efluentes contaminados por petróleo. Blucher Chemistry Proceedings. v. 3, n. 1, 2015.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: Bononi, V. L.R.; Grandi, R. A. P. (org.). Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, São Paulo, . 107-139pp. 1998.

MACELLARO, G., et al. **Fungal laccases degradation of endocrine disrupting compounds**. BioMed Res. Int. 614038. 2014.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H.J.C; DARDENNE, L.E. **Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos**. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Livraria da Física, 2007, p. 489-531.

MATE, D.M; ALCAIDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. Microbial Biotechnology., v 10, p.1457–1467., 2016.

MEDRADO, Lais Camargo de Lacerda. **Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina utilizando lacases produzidas pelo fungo pleurotus ostreatus**. Goiânia, 2017. 109 f. il. col. [Acessado 5 Maio 2022] Disponível em: https://www.ifg.edu.br/attachments/article/5213/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Pr ocessos%20Sustent%C3%A1veis_Lais%20Camargo%20de%20Lacerda%20Medrado.pdf

MEHRA, R. et al. **A structural-chemical explanation of fungal laccase activity**. Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 17285, 2018.

MO, D. et al. **Molecular docking simulation on the interactions of laccase from Trametes versicolor with nonylphenol and octylphenol isomers**.

Bioprocess and biosystems engineering, v. 41, n. 3, p. 331-343, 2018.

MONTAGNER, Cassiana C., Vidal, Cristiane e Acayaba, Raphael d. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios**. Química Nova [online]. 2017, v. 40, n. 9 [Acessado 5 Maio 2022] , pp. 1094-1110. Disponível em: <<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>>.

NATALIA KODAMA. **Ftalatos: o que é, o que tem, o que pode causar**. Disponível em: <http://nataliaykodama.blogspot.com/2012/05/efeito-exposicao-ao-ftalato-plasticos.html#.YnveDOjMLIU>. Acesso em: 5 mai. 2022.

NELSON, DAVID L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da

Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014.

PACHECO, Sabrina M. V. e Soares, Carlos Henrique L. **Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras**. Química Nova [online]. 2014, v. 37, n. 2 [Acessado 11 Maio 2022] , pp. 209-214. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140036>>.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, ASHOK. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In: BRAHMACHARI, G. (Ed). Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. p. 13 – 39. Elsevier, 2017;

PRASAD, N. K. et al. **In silico analysis of Pycnoporus cinnabarinus laccase active site with toxic industrial dyes**. Journal of molecular modeling, v. 18, n. 5, p. 2013-2019, 2012.

RANCAÑO, Gonzalo & Lorenzo, Miriam & Molares, Norma & Rodriguez-Couto, Susana & Sanromán, Maria. (2003). **Production of laccase by Trametes versicolor in an airlift fermentor**. Process Biochemistry. 39. 467-473. 10.1016/S0032-9592(03)00083-9.

RIVERA-HOYOS, Claudia M. et al. **Fungal laccases**. Fungal Biology Reviews. 27:67-82, 2013.

RONCAGLIONI, A., BENFENATI, E. **In silico-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects**. Chem. Soc. Rev. v. 37, p. 441–450, 2008.

SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification , biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from Trametes pubescens. Bioresource Technology, v. 128, p. 49–57, 2013.

SOARES, A. F. S.; LEÃO, M. M. D. **Contaminação dos mananciais por micropoluentes e a precária remoção desses contaminantes nos tratamentos convencionais de água para potabilização**. Assuntos Gerais Doutrina Internacional, v. 14, n. 24, p. 36–85, 2015.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. **Origem E Destino De Interferentes Endócrinos Em Águas Naturais**. Caderno Temático, v. 6, 2007. [Acessado 5 Maio 2022], Disponível em: <<https://www.aqua.unb.br/images/Artigos/Tematicos/emergentes.pdf>>.

SOUZA, Angélica Vieira da Silva Bertoncello. **S729 Otimização da produção de lacase pelo fungo *Trametes sp.* para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso**. Curitiba, 2017. 9 [Acessado 5 Maio 2022] Disponível em: <<https://hdl.handle.net/1884/53037>>

SPINA, F. et al. **Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity**. Journal of Cleaner Production, v. 100, p. 185-194, 2015.

SURESH, P. S. et al. **An Insilco approach to bioremediation: Laccase as a case study**. Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 26, n. 5, p. 845-849, 2008.

YING, GG; KOOKANA, RS; RU, Y.; RU, JR **Ocorrência e destino dos esteróides hormonais no ambiente**. Ambiente. Int., v. 28, n. 6, pág. 545-551, 2002. [Acessado 6 Maio 2022], Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2)>

TAN, Y.H., GOH, P.S., ISMAIL, A.F. **Development of photo-catalytic coupled zinciron oxide nanoparticles via solution combustion for bisphenol A removal**. Int. Biodeter. Biodegr., v. 102, p. 346 e 352., 2015.

TAVARES, S. R. L. Técnicas de Remediação. In: TAVARES, S. R. de L. **Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados: conceitos básicos e fundamentos**. Joinville: Clube de Autores, 2013. cap. 2, p. 61-90.

ZAMPIERI, L. A. **Bioxidação fúngica de valenceno a nootkatona, bioflavorizante de grapefruit**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Setor de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ZHANG, Yu et al. **Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 7-12, 2012.

Anexo I

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 39
T.pubescens MSRFQSLLAFFVVASLAAVAHAHAGIGPVADLTISNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 60
          *****:*****

1KYA      MGRDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 99
T.pubescens KGNDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGNSFLYNFQV 120
          ** .*****:****:***

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDVDNDDTVITLVDWYHVAAKLG 159
T.pubescens PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPSADLYDVDNDDTVITLVDWYHVAAKLG 180
          *****:*****

1KYA      PAFPLCADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLVSLSCDPNYTFSIDGHNMT 219
T.pubescens PAFPLCADATLINGKGRSPSTTTADLAVISVTAGKRYRFRVLVSLSCDPNYVFSIDGHNMT 240
          *****:*****

1KYA      I IETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEANQAVDNYWIRANPFGNVGFTGGINSAIL 279
T.pubescens I IETDSINTQPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEANQAVDNYWIRANPFGNVGFTGGINSAIL 300
          *****

1KYA      RYDGAAAVEPTTTQTTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENGTNFFI 339
T.pubescens RYDGAAAIEPTTTQTTSTQPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENGTNFFI 360
          *****:*****

1KYA      NGASFPTPTVPVLLQIIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAABGAPHPFHL 399
T.pubescens NGASFPTPTVPVLLQIIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATTAABGAPHPFHL 420
          *****:*****

1KYA      HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRDNDNPGPWFHLCHIDFHL 459
T.pubescens HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRDNDNPGPWFHLCHIDFHL 480
          *****

1KYA      EAGFAVVFAEDI PDVASANPVPQAWS DLCPTYDARDPSDQ 499
T.pubescens EAGFAVVFAEDI PDVASANPVPQAWS DLCPIYDALDPSDQ 520
          *****

```

Figura 12. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes pubescens* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVNVGGTPGPLITGN 39
T.hirsuta] MSRFQSLLAFFVVASLAAVAHAAGPTADLTISNAEVSPDGFARQAVVNVNTPGPLVAGN 60
           .**.*:**:* **:**:*** **:**:***
1KYA      MGDRFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISGHSFLYDFQV 99
T.hirsuta] KGDRFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFVNQCPISGHSFLYDFQV 120
           *****:***** * .*****:*****:*****:*****
1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDVNDNDDTITLVDWYHVAAKLG 159
T.hirsuta] PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPHASLYDVNDNDDTITLADWYHTAAKLG 180
           *****:***** * .*****:*****:*****:*****
1KYA      PAFPLGADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRLVLSLCPNYTFSIDGHNMT 219
T.hirsuta] PAFPLGADATLINGLGRSPSTTAADLAVINVTGKRYRFRLVLSLCPNHHTFSIDGHDLT 240
           *****:*****:***:*.* ** *****:*****:*****:***
1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWIRANPFGNVGFTGGINSAIL 279
T.hirsuta] IIEVDSINSQPLVVDSIQIFAAQRYSFVLNADQDVGNYWIRANPFGNVGFAGGINSAIL 300
           ***.*:**: *****:*****:*** * .*****:*****:*****:***
1KYA      RYDGAAAVEPTTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENTNFFI 339
T.hirsuta] RYDGADPVEPTTTQTTPTKPLNEVDLHPLATMAVPGSPVAGGVDTAINMAFNENTNFFI 360
           ***** * *****:***: * .*****:*****:*****:*****
1KYA      NGASFVPPVFPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL 399
T.hirsuta] NGASFVPPVFPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL 420
           *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
1KYA      HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRDVVSTGT PAAGDNVTIRFRTDNP GPWFLHCHDFHL 459
T.hirsuta] HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRDVVSTGT PAAGDNVTIRFRTDNP GPWFLHCHDFHL 480
           *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
1KYA      EAGFAVVAEDIPDVASANPVPQAWSDLCPYDARDPSDQ 499
T.hirsuta] EAGFAVVAEDIPDVASANPVPQAWSDLCPYDALDVNDQ 520
           *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 14. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes hirsuta* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTIITNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 39
T.gibbosa MSRFQTLLEAFVVTSLTAAAYAAIGPVADLTIITNAEVS PDGFARQAVVVNGGTPGPLVTGN 60
          .*****  *****:*****:*****:***

1KYA      MDRFQLNVIDNLNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCP ISSGHSFLYDFQV 99
T.gibbosa MDRFQLNVIDNLNHTMLKSTSIHWHGFFQHGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFQV 120
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:***

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDVND DDTVITLVDWYHVA AKLG 159
T.gibbosa PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPHASLYDVND DDTVITLADWYHVA AKLG 180
          ***** * .***** .*****:***

1KYA      PAFPLCADATLINGKGRSPSTTTADLSVIVTTPGKRYRFR LVLVSLSCIPNYTFSIDGHNMT 219
T.gibbosa PRFPLCADATLINGLGRSPSTVSADLSVINVTTPGKRYRFR LVLVSLSCIPNHTFSIDGHDLT 240
          * ***** .:***** .*****:*****:*****:***

1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWIRAN PFGNVGFTGGINSAIL 279
T.gibbosa IIETDSVNTQPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWVRAN PFGNVGFTGGINSAIL 300
          *****:* *****:***** *****:*****:*****:***

1KYA      RYDGA AAVEPTTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGV DLA INMAFNENCTNFEFI 339
T.gibbosa RYDGAFAVEPTTTQTPTKPLNEVDLHPLTPMPVPGEPVAGGV DKL NMAFNENCTNFEFI 360
          ***** ***** * *****:***** . *****:*****:*****:***

1KYA      NGASFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYVLP SNADIEISFPATAA AFGAPHPFHL 399
T.gibbosa NGASFEPPTVPVLLQILSGAQTAQELLPSGSVYVLP SNASIEISFPATAA AFGAPHPFHL 420
          *****:*****:*****:***** *****:*****:*****:*****

1KYA      HGHAFAVVR SAGSTVYNDNPIFRD VVSTGTPAAGDNVTIRFRTD NPGPWFLHCHIDFHL 459
T.gibbosa HGHTFAVVR SAGSTEYNDNPIFRD VVSTGTPAAGDNVTIRFQT NNP GPWFLHCHIDFHL 480
          ***:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      EAGFAVVF AEDIPDVASANPVPQAWS DLCPT YDARDPSDQ 499
T.gibbosa DAGFAVVF AEDIPDVQAVNPVPQAWS DLCPIYDALDPSDQ 520
          :*****:***** .:***** ***** *****
    
```

Figura 15. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes gibbosa* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma; em azul a variação do aminoácido da sequência primária em relação a sequência primária do ligante. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVNVGGTTPGPLITGN 39
T.elegans MSNFQSLLSFIIITFAALAHAGIGPVTDLTLTNAEVSPDGFARQAVVNVGVTTPGPLITGN 60
          *****:***:*** *****:***** *****

1KYA      MGRDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 99
T.elegans EGDHFQLNVIDQLTNHTMLKSTSIHWHGFFQHGKTNWADGPAFINQCPISTGHSFLYDFQV 120
          **:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDVNDTDTVITLVDWYHVAAKLG 159
T.elegans PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPHASLYDVNDTDTVITLADWYHVAAKLG 180
          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PAFPLCADATLINGKRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRVLVSLSCPNYTFSIDGHNMT 219
T.elegans PSFPLCADATLINGLRSPGTTADLAVINVTQGKRYRFRVLVSLSCPNIHVFSIDGHLT 240
          *:*****:*****:*****:***:*** *****:*****:*****:***

1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAQVDNYWIRANPEGNGVFTGGINSAIL 279
T.elegans VIEADAVNTQPLVVDSIQIFAAQRYSFVLNANQPVNDNYWIRANPEGNGVFEGGINSAIL 300
          :*:***:*** *****:*****:*** *****:*****:*****:***

1KYA      RYDGAHAVEPTTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENCTNFI 339
T.elegans RYDGAAPTEPTTNQTTSTKPLNEVDLHLASTPVPSPVSGGVDLAINMAFNENCTNFI 360
          *****:*****:***** *****:*** *:*** *****:*****:*****:*****

1KYA      NGASFTPPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAEPGAPHPFHL 399
T.elegans NGESFVPPTVPVLLQIISGAQTAQDLLPTGSVYSLPSNASIEISFPATAAEPGAPHPFHL 420
          ** *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      HGHAFAVVRSA GSTVYNDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFRTDNPGPWFLHCHDFHL 459
T.elegans HGHTFAVVRSA GSTAYNDNPNVFRDVVNTGTPANNNDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHDFHL 480
          ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      EAGFAVVF AEDI PDVASANPVPQAWS DLCPTYDARDPSDQ 499
T.elegans EAGFAVVM AEDI PDVKSVPVPQAWS DLCPTYNALDPSDQ 520
          *****:***** *:*****:*****:*****:*****

```

Figura 18. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes elegans* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma; em azul a variação do aminoácido da sequência primária em relação a sequência primária do ligante. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA      -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVGTPGPLITGN 39
T.polyzona MSRFNQLLAFVIASLSAVALAAVGPVADLTISNAEISPDGFPQAVVVGVSPPGPIISGN 60
          .:*****:* * :***** ***** :*:*:*:*

1KYA      MGRDFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 99
T.polyzona KGDRFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPVSPGHAFLYDFQV 120
          * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDNDTITLVDWYHVAAKLG 159
T.polyzona PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFFVYDPNDPHKSRVDNDTITLSDWYHVAAKLG 180
          * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      PAFPLGADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRLVLSLSCPNYTFSIDGHNMT 219
T.polyzona PRFPLGADATLINGKGRSPSTVSADLAVINVTAGKRYRFRLASLSCPNHVFSIDGHTMT 240
          * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      IIETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWIRANPFGGNVGTGGINSAIL 279
T.polyzona IIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWIRANPFGGNTGFAGGINSAIL 300
          * *:*:* * * *****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      RYDGAAAVEPTTTQTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNFTNFFI 339
T.polyzona RYDGAPAVEPTTTQTASTKPLNEVDLHPLESMVPVPGKPVAGGVDKAINMAFNFTNFFI 360
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      NGASFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL 399
T.polyzona NGASFVPTPTVPVLLQILSGAQTQDLLPEGSIVYLPNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL 420
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRDVVSTGT PAAGDNVTIRFR TDNPGPWFLHCHDFHL 459
T.polyzona HGHTFAVVRSA GSTEYNYDNPIFRDVVSTGT PAANDNVTIRFR TDNPGPWFLHCHDFHL 480
          * *:*:* * * *****:*****:*****:*****:*****:*****

1KYA      EAGFAVVAEDIPDVASANPVPQAWS DLCPT YDARDPSDQ 499
T.polyzona EGGFAVVAEDTPDVKAVNPVPQAWS DLCPT YDALDPNDQ 520
          * .*****:* * * * :.*****:*****:*****:*****:*****
    
```

Figura 19. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacasse da *Trametes polyzona* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1KYA          -----GIGPVADLTITNAAVSPDGFSRQAVVVNGGTPGPLITGN 39
Dichomitus    MAKFMCLLSYVTLTLLFAASAYAGIGPVTDLTITNADIAPDNFTRAAIVVNGVFPAPLITGN 60
               ****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          MGDRLFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPISSGHSFLYDFQV 99
Dichomitus    KGDRLFQLNVVDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGNSFLYDFQV 120
               *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPAADLYDNDTDTITLVDWYHVAAKLG 159
Dichomitus    PDQSGTYWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPQDPHASLYDDDSTVITLVDWYHVAARVG 180
               ***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          PAFPLCADATLINGKGRSPSTTTADLSVISVTPGKRYRFRLVLSLCPNYTFSIDGHNMT 219
Dichomitus    PRFPLGSDSTLINGLGRSPSTPTADLAVISVTPGKRYRFRLVLSLCPNYVFSIDNHDLT 240
               *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          ILETDSINTAPLVVDSIQIFAAQRYSFVLEAQAVDNYWIRANPEGNVGFTGGINSAIL 279
Dichomitus    VIEADGIETQPVTVNAIQIFAAQRYSFVLTANQTIDNYWIRANPEGNVGFTDGINSAI 300
               :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          RYDGAAAVEPTTTQTTSTAPLNEVNLHPLVATAVPGSPVAGGVDLAINMAFNENTNFFI 339
Dichomitus    RYDGAASIEPTTSQQVTVQNLLEATLAPLTARVTPGTAVQGGVDKAINLDFNENTNFFI 360
               *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          NGASFPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSVYSLPSNADIEISFPATAAAPGAPHPFHL 399
Dichomitus    NNASFVPTPTVPVLLQIISGAQNAQDLLPSGSLYELFINSSIEISFPATTNAPGAPHPFHL 420
               *.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*

1KYA          HGHAFAVVRSA GSTVYNYDNP IFRD VVSTGT PAAGDNVTIRFR TDNPGPWFLHCHDFHL 459
Dichomitus    HGHAFAVVRSA GSTEYNYDNP VWRD VVSTGT PAAGDNVTIRFQ TDNPGPWFLHCHDFHL 480
               *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

1KYA          EAGFAVVF AEDIPDVASANPVPQAWS DLCPT YDARDPSDQ 499
Dichomitus    DAGFAVVMVEDIPDTTSANPVPQAWS DLCPT YDAL SADDL 520
               :*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

Figura 20. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA da lacase da *Dichomitus squalens* e da lacase ativa 1KYA obtida a partir do Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos destacados estão envolvidos nas interações intermoleculares: Em verde é possível identificar as interações ou ligação de hidrogênio e as interações de Van der Waals; em rosa as interações Pi-Sigma. (*): resíduos conservados; (:): resíduos conservativos e (.) resíduos semiconservativos. **Fonte:** Dados do autor.

